

*Н.Н. Фурик, к.т.н., доцент, Е.Н. Бирюк, к.с-х.н., Н.К. Жабанос, к.т.н., доцент,  
А.С. Савастюк, Н.В. Нахаева  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫРЬЯ, ПРОМЫШЛЕННЫХ СРЕД И  
МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ, ОТОБРАННЫХ НА  
МОЛОКОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ, НА НАЛИЧИЕ БАКТЕРИОФАГОВ И ФАГОВЫХ  
АССОЦИАЦИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

*N. Furyk, A. Biruk, N. Zhabanos, H. Savastsiuk, N. Nakhayeva  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

**MOLECULAR-GENETIC DETECTION OF BACTERIOPHAGES AND  
PHAGE ASSOCIATIONS IN RAW MATERIALS, INDUSTRIAL MEDIA,  
AND DAIRY PRODUCTS SAMPLED AT DAIRY-PROCESSING PLANTS OF  
THE REPUBLIC OF BELARUS**

*e-mail: furik\_nn@ tut.by, biohimbel@yandex.by, nzhabanos@tut.by,  
ann.1825338@gmail.com, natalianaeva@gmail.com*

*Исследованы 183 образца молочного сырья, промышленных сред, ферментированных молочных продуктов, отобранные на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь. 36,1 % фагосодержащих образцов содержат лактофаги группы 936, 25,1 % образцов содержат лактофаги группы C2, 19,1 % образцов содержат лактофаги группы p335. Из 4 групп бактериофагов термофильного стрептококка наиболее часто встречается группа cos (в 7,65 % образцов), в другом месте группа 5093 (в 3,28 % образцов), бактериофаги групп pac и 987 выявлены в 1,09 % и в 1,63 % образцов соответственно. Установлено, что в 60,5% исследованных образцов присутствуют фаговые ассоциации, содержащие от 2 до 5 видов фагов молочнокислых бактерий. Проведен анализ видового состава бактериофагов в разных группах ферментированных молочных продуктах.*

*A total of 183 samples of dairy raw materials, industrial media, and fermented dairy products collected from dairy-processing enterprises of the Republic of Belarus were examined. Among phage-positive samples, 36.1 % contained lactophages of the 936 group, 25.1 % contained lactophages of the C2 group, and 19.1 % contained lactophages of the P335 group. Of the four bacteriophage groups infecting Streptococcus thermophilus, the cos group was the most prevalent (7.65 % of samples), followed by the 5093 group (3.28 % of samples), while bacteriophages of the pac and 987 groups were detected in 1.09 % and 1.63 % of samples, respectively. Phage associations comprising two to five types of lactic acid bacterial phages were identified in 60.5 % of the analyzed samples. The species composition of bacteriophages in different categories of fermented dairy products was analyzed.*

**Ключевые слова:** ферментированные молочные продукты, бактериофаги, фаговые ассоциации, лактококки, термофильный стрептококк, ПЦР

**Key words:** fermented dairy products, bacteriophages, phage associations, lactococci, thermophilic streptococci, PCR

**Введение.** Одна из наиболее распространенных причин торможения развития молочнокислых бактерий при производстве ферментированных молочных продуктов – поражение заквасочной микрофлоры бактериофагами [1]. От устойчивости культур к бактериофагам, присутствующим в биотехнологическом цикле конкретного продукта и на определенном предприятии, зависит качество готового продукта.

Проблема бактериофагии известна и изучается давно, но полностью ее решить в биотехнологии ферментированных продуктов пока не удаётся. Это обусловлено изменчивостью бактериофагов при действии различных факторов, что диктует необходимость постоянного изучения их свойств.

Согласно литературным данным, обновление спектра вирулентных фагов, специфичных по отношению к самым распространенным и наиболее широко используемым заквасочным культурам *Lactococcus lactis* и *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, происходит ежегодно, что связано с их чрезвычайно интенсивной изменчивостью [2, 3].

Разнообразие бактериофагов в ферментированных продуктах варьирует в зависимости от географии, климата, окружающей среды, типа сырья, технологии, оборудования и микробного состава заквасочных культур. Появление новых фаговых групп возможно путем их рекомбинации с фагами других стрептококковых или лактококковых видов [4, 5].

Все известные в настоящее время фаги молочнокислых бактерий принадлежат к классу *Caudoviricetes*. Лактококковые фаги (или лактофаги) классифицируются на основе их морфологии и нуклеотидной гомологии на 10 таксономических групп. Среди описанных лактококковых фаговых групп три наиболее часто встречается в промышленных ферментациях: группы P335, *Skunaviruses* (ранее 936) и *Ceduoviruses* (ранее C2) [5].

Фаги термофильного стрептококка в настоящий момент подразделяют на 5 групп *Moineaviruses* (ранее cos), *Brussowviruses* (ранее pac), *Vansinderenvirus* (ранее называлась группой 5093), 987 и P738 [5, 6]. Из них наиболее распространёнными являются группы *Moineaviruses* и *Brussowviruses* (69 % и 29 % соответственно) классифицированные на основе структурного профилирования их белков и механизмов упаковки ДНК [7].

**Материалы, объекты и методы исследований.** Объектами исследования являлись 183 образца молочного сырья, промышленных сред, ферментированных молочных продуктов (сметаны, кисломолочных напитков, творога и творожных продуктов, сыров), отобранные на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь.

В исследовании применяли общепринятые молекулярно-генетические методы. Видовой состав фагов и фаговых ассоциаций в образцах молочного сырья определяли методом ПЦР с использованием специфичных праймеров.

**Результаты и их обсуждение.** При проведении исследований проанализированы 183 образца молочного сырья, промышленных сред, ферментированных молочных продуктов (сметаны, кисломолочных напитков, творога и творожных продуктов, сыров), отобранные на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь.

С использованием молекулярно-генетических методов в 101 образце обнаружены фрагменты ДНК бактериофагов, в 73 образцах из них обнаружены фрагменты ДНК бактериофагов лактококков. В 23 образцах обнаружены фрагменты ДНК характерные как для лактофагов, так и для фагов термофильного стрептококка. В 5 образцах обнаружены фрагменты ДНК бактериофагов только термофильного стрептококка.

Для анализа распределения различных групп бактериофагов, поражающих лактококки и термофильный стрептококк, был проведён подсчёт их встречаемости. Результаты представлены на рисунке 1, где отражена частота обнаружения каждой группы бактериофагов в процентном соотношении.

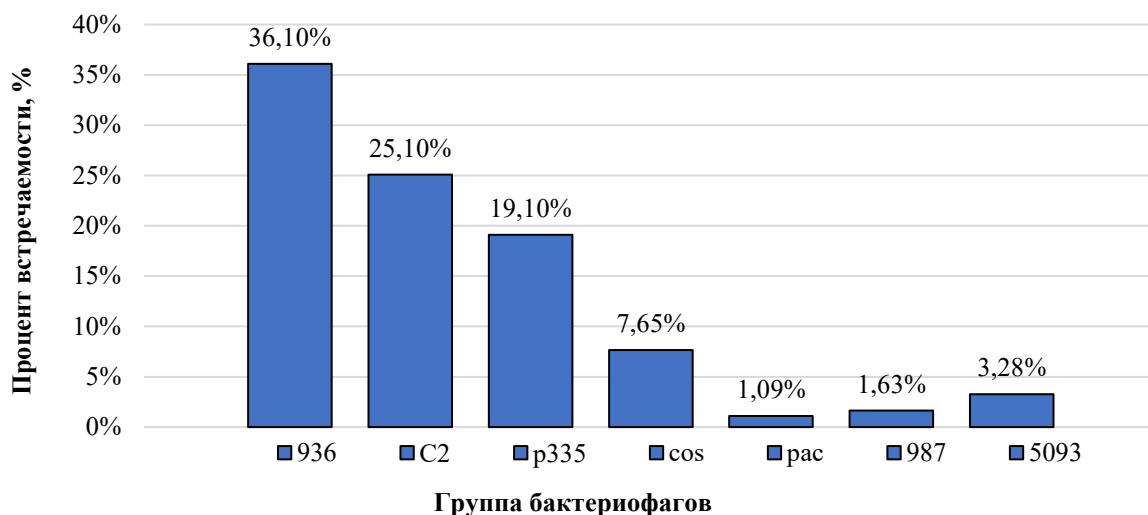


Рисунок 1 – Частота обнаружения каждой группы бактериофагов в процентном соотношении

Источник данных: собственная разработка.

Среди бактериофагов, поражающих лактококки, наибольшую распространённость имеет группа 936, которая составляет 36,10 % от всех выявленных фагов. За ней следуют группы C2 (25,10 %) и p335 (19,10 %). Остальные группы, относящиеся к бактериофагам термофильного стрептококка, такие как cos, pac, 987 и 5093, встречаются значительно реже, их суммарная доля составляет менее 12 %.

В то же время среди этих групп бактериофагов наибольшая доля приходится на группу cos – 7,65 %, что делает её самой активной в данной категории. Группа 5093 выявлена в 3,28 % случаев, а группы pac и 987 имеют минимальные показатели – 1,09 % и 1,63 % соответственно. Таким образом, фаги, поражающие термофильный стрептококк, встречаются реже, чем фаги лактококков.

Бактериофаги в образцах молочной продукции и производственных сред обнаруживаются как поодиночке, так и в составе фаговых ассоциаций.

Распределение образцов по количеству обнаруженных групп бактериофагов представлено на рисунке 2.

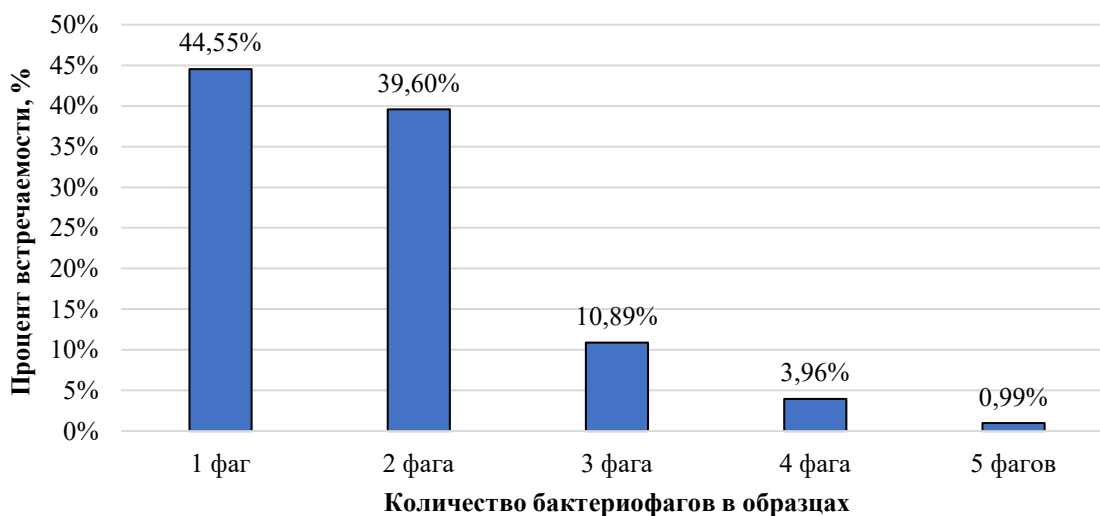


Рисунок 2 – Распределение образцов по количеству обнаруженных групп бактериофагов

Источник данных: собственная разработка.

Наибольшая часть образцов содержит только одну или две группы фагов, что свидетельствует как о распространенности монофаговых инфекций, так и о формировании стабильных ассоциаций из двух бактериофагов. Наличие трёх групп фагов наблюдается гораздо реже, а образцы с четырьмя и пятью группами фагов встречаются еще реже.

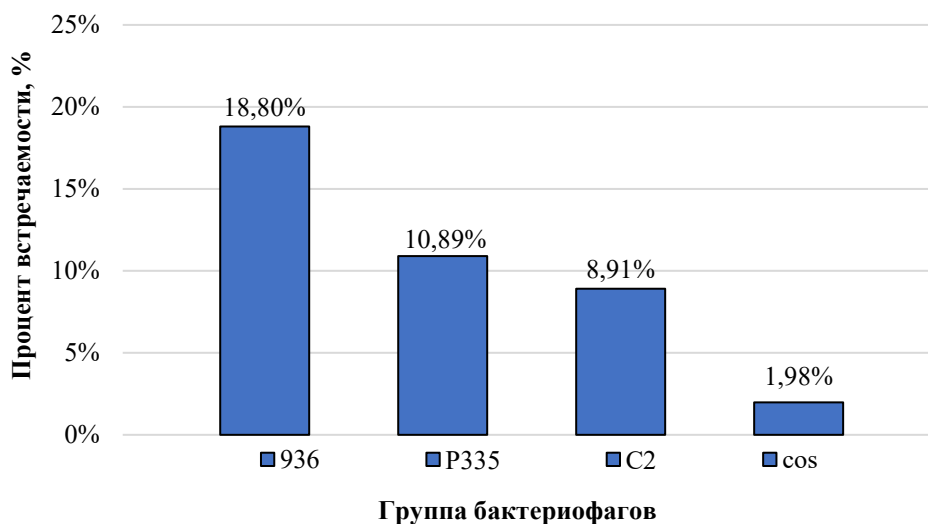


Рисунок 3 – Частота обнаружения монофагов в процентном соотношении  
 Источник данных: собственная разработка.

Группы монофагов, обнаруженные среди исследованных образцов молочного сырья, молочной продукции и промышленных сред представлены на рисунке 3. Наибольшая доля приходится на группу 936 которая составляет 18,80 %. Группа P335 занимает второе место с показателем 10,89 %, а группа C2 встречается в 8,91 % случаев. Группа cos имеет минимальную распространённость среди чистых групп и составляет 1,98 %.

Также проведен анализ частоты встречаемости различных групп фагов и их ассоциаций в фагосодержащих образцах (табл. 1)

Таблица 1 – Частота встречаемости различных групп фагов и их ассоциаций в фагосодержащих образцах

Группа фагов	Количество фагосодержащих образцов	Процент встречаемости, %
1	2	3
P335	11	10,8
C2	9	8,9
936	20	19,8
P335, 936	9	8,9
P335, C2	6	5,9
C2, 936	16	15,8
P335, C2, 936	2	2
P335, 5093	1	1
C2,cos	1	1
936, cos	4	4
936, 5093	2	2
P335, 987, 5093	1	1
P335, C2, 936, cos	1	1
P335, C2, 936, 5093	1	1

Продолжение таблицы 1

1	2	3
P335, C2, 936, cos, pac	1	1
P335, 936, pac, 5093	1	1
C2, 936, Cos, 5093	1	1
P335, 936, pac, 5093	1	1
C2, 936, Cos, 5093	1	1
cos	5	5
C2 и 936, 987	2	2
C2 и 936, cos	6	5,9
P335 и cos	1	1
<b>Всего</b>		<b>101</b>

Источник данных: собственная разработка.

Большую долю среди всех обнаруженных бактериофагов составляют лактофаги, что объясняется использованием в составе заквасок в основном лактококковых молочнокислых бактерий.

Среди всех групп наиболее значимой является группа 936, которая встречается не только среди чистых групп фагов (19,8 %), но и активно участвует в различных ассоциациях, что указывает на её ведущую роль в экосистеме или высокую способность инфицировать бактерии-хозяева. Наиболее распространённая ассоциация – C2 и 936 (15,8 %), что может быть связано с их комплементарными механизмами действия или наличием общего хозяина. Ассоциации, включающие три и более группы фагов, подчёркивают сложность взаимодействий и возможность их существования в уникальных экологических нишах.

Проведя анализ бактериофагов термофильного стрептококка, можно сделать несколько выводов. Группа cos является наиболее распространённой среди термофильных фагов, так как она встречается как в чистом виде, так и в ассоциациях с другими фагами, включая доминирующую группу 936. Остальные группы термофильного стрептококка – pac, 987 и 5093 – практически всегда обнаруживаются в составе сложных ассоциаций, что может свидетельствовать об их зависимости от взаимодействия с другими бактериофагами для успешной инфекции или выживания в экосистеме.

На основе анализа выделенных бактериофагов представлены данные о видовом разнообразии и встречаемости фагов в образцах ферментированных молочных продуктов.

На рисунках 4–7 представлены данные о видовом разнообразии и встречаемости бактериофагов в различных образцах кисломолочной продукции.

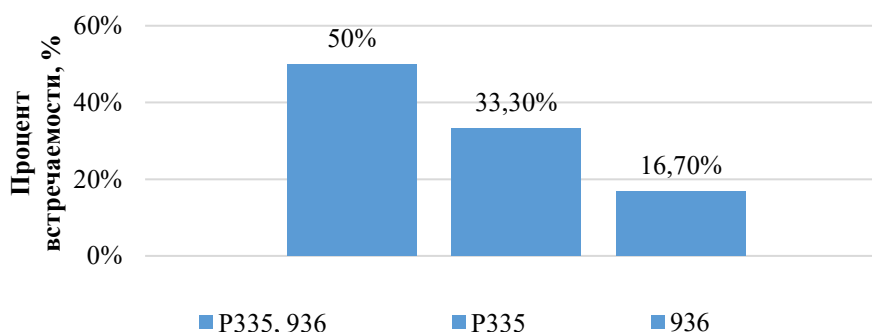


Рисунок 4 – Встречаемость бактериофагов различных групп в образцах сметаны

Источник данных: собственная разработка.

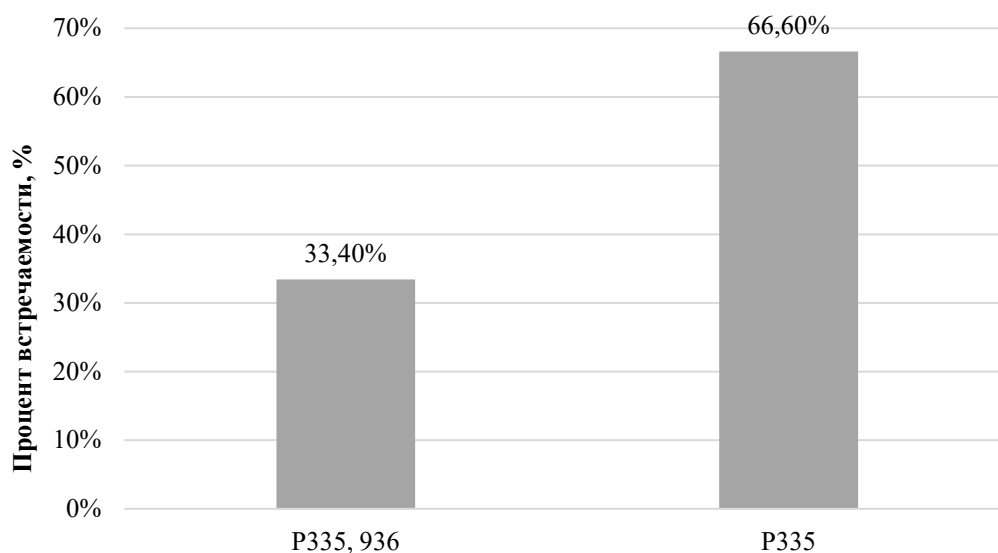


Рисунок 5 – Встречаемость бактериофагов различных групп в образцах кефира  
Источник данных: собственная разработка.

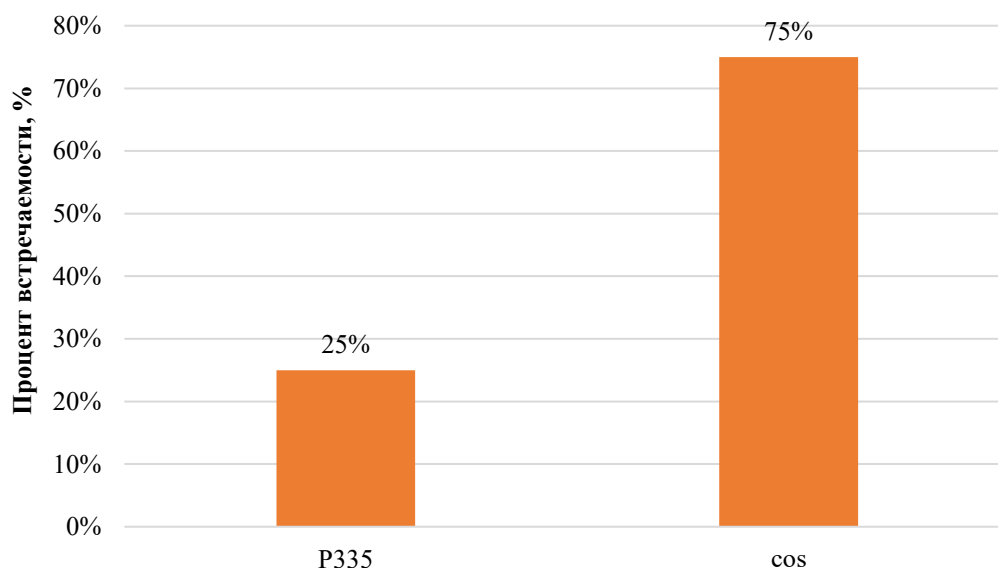


Рисунок 6 – Встречаемость бактериофагов различных групп в образцах йогурта и других кисломолочных продуктах, изготавливаемых с использованием термофильных микроорганизмов  
Источник данных: собственная разработка.

В кисломолочной продукции наблюдается преобладание фагов группы P335, которые встречаются как в чистом виде, так и в комбинации с другими группами фагов.

Фаги группы 936 представлены в продуктах, при изготовлении которых используются в основном закваски мезофильных культур. Комбинации групп P335 и 936 указывают на возможное взаимодействие между фагами и способность адаптироваться к различным условиям ферментации.

Группа cos представлена сравнительно широко в образцах, отобранных при производстве продуктов, изготавливаемых с использованием заквасок термофильных культур, это подтверждает, что фаги группы cos хорошо адаптированы к высоким температурам.

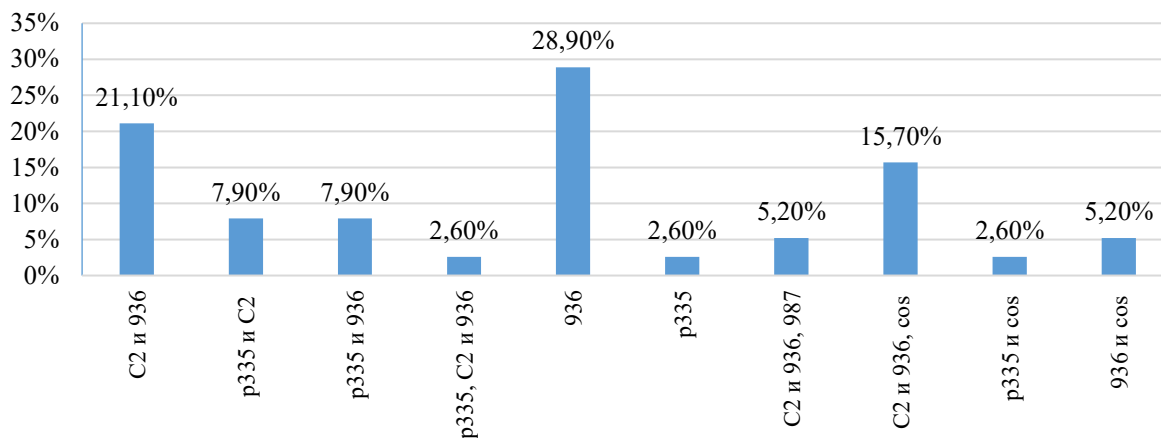


Рисунок 7 – Встречаемость бактериофагов различных групп в образцах творога  
 Источник данных: собственная разработка.

В творогах доминируют фаги группы 936. Фаги группы C2 также активно представлены, но в большей степени в ассоциациях, особенно с группой 936. Фаги группы cos присутствуют в меньшей степени, в основном в сочетаниях, что указывает на их вторичную роль в процессе инфицирования. Установлено, что в твороге практически отсутствуют сложные ассоциации с термофильными группами, такими как рас и 5093. Вместе с тем, распространенность фаговых ассоциаций и их видовое разнообразие намного выше в данной группе молочных продуктов по сравнению с ранее рассмотренными группами.

Бактериофаги и фаговые ассоциации, обнаруживаемые в сырах, представлены на рисунке 8.

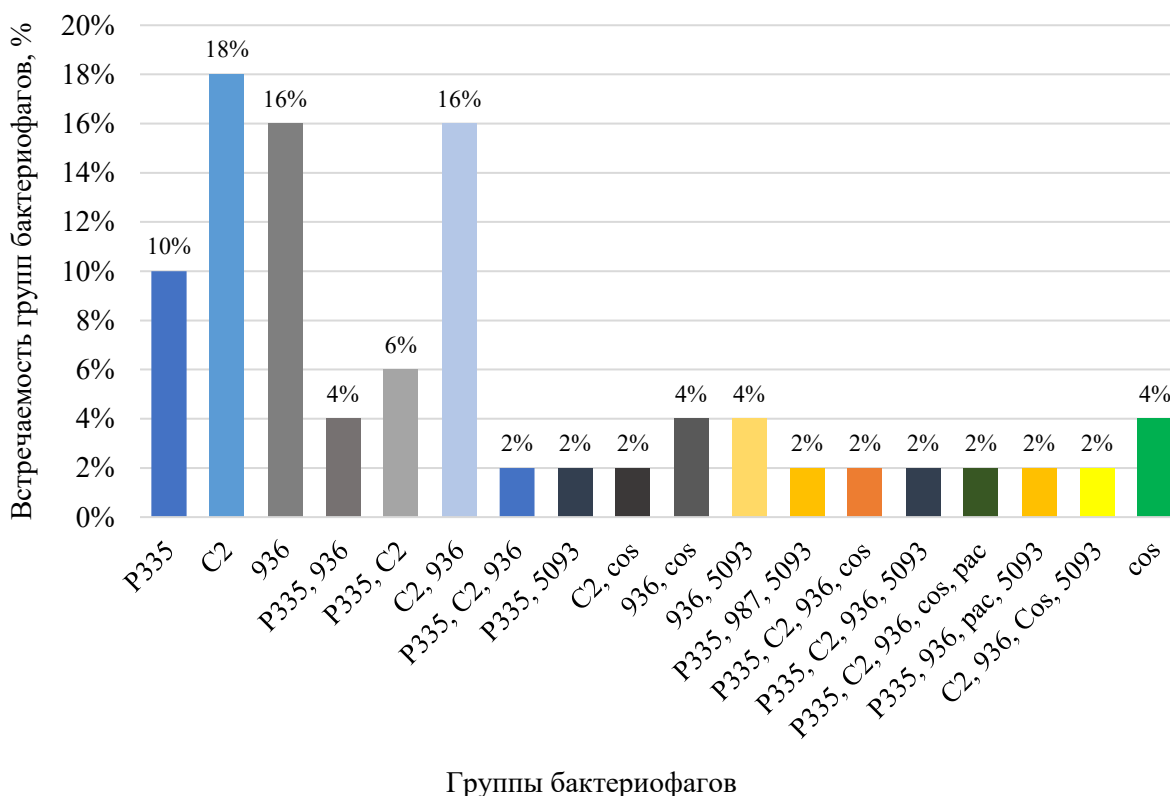


Рисунок 8 – Встречаемость бактериофагов различных групп в образцах сыра  
 Источник данных: собственная разработка.

В сыре наиболее часто встречаются фаги группы С2, что является следствием широкого использования мезофильных культур в составе сырных заквасок. Группа 936 также встречается часто, причём её значимость проявляется и в сочетаниях с другими фагами, такими как С2 и Р335. Среди термофильных бактериофагов проявляет наибольшую активность группа cos. Более сложные ассоциации с термофильными фагами, например, 936, рас, 5093 или Р335, С2, 936, cos, рас, встречаются редко. Вместе с тем, это может свидетельствовать о широком разнообразии производимых на одном технологическом оборудовании видов сыров и заквасочных культур-хозяев, используемых для их изготовления, а также о специфике технологических режимов, используемых в сыроделии.

**Выводы.** В ходе выполнения работы исследованы 183 образца молочного сырья, промышленных сред, ферментированных молочных продуктов (сметаны, кисломолочных напитков, творога и творожных продуктов, сыров), отобранные на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь. В 101 образце обнаружены фрагменты ДНК бактериофагов, из них в 73 образцах обнаружены фрагменты ДНК бактериофагов лактококков. В 23 образцах обнаружены фрагменты ДНК характерные как для лактофагов, так и для фагов термофильного стрептококка. В 5 образцах обнаружены фрагменты ДНК бактериофагов только термофильного стрептококка. В исследованных образцах молочной продукции и производственных сред: 36,1 % содержат лактофаги группы 936, 25,1 % содержат лактофаги группы С2, а 19,1 % образцов содержат лактофаги группы р335. Из 4 групп бактериофагов термофильного стрептококка наиболее часто встречается группа cos (в 7,65 % образцов), на втором месте группа 5093 (в 3,28 % образцов), бактериофаги групп рас и 987 выявлены только в 1,09 % и в 1,63 % образцов соответственно. Установлено, что в 60,5 % исследованных образцов присутствуют ассоциации фагов разных видов. Проведен анализ видового состава бактериофагов в разных группах ферментированных молочных продуктах. Установлено наличие фаговых ассоциаций, содержащих от 2 до 5 видов фагов молочнокислых бактерий в 68,5 % фагосодержащих образцов творога, 56 % фагосодержащих образцах сыров, 50 % фагосодержащих образцов сметаны и в 33,4 % фагосодержащих образцов кефира.

### Список использованных источников

- |  |   |
|--|---|
| <p>1. Сорокина, Н. П. Активность заквасочной микрофлоры: причины снижения и способы повышения. Методы предотвращения поражения молочнокислых бактерий бактериофагами / Н. П. Сорокина, Г. Д. Перфильева // Молочная промышленность. – 2013. – № 11. – С. 32–35.</p> <p>2. Молекулярно-генетические свойства распространенных в Беларуси бактериофагов лактококков / А. П. Райский, Н. А. Белясова, А. Л. Лагоненко [и др.] // Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2009. – № 1. – С. 70–73.</p> | <p>1. Sorokina, N. P. Aktivnost zakvasochnoj mikroflory: prichiny snizheniya i sposoby povysheniya. Metody predotvrasheniya porazheniya molochnokislykh bakterij bakteriofagami [Starter culture microflora activity: causes of decline and ways to increase it. Methods for preventing lactic acid bacteria from being damaged by bacteriophages] / N. P. Sorokina, G. D. Perfileva //Molochnaya promyshlennost. – 2013. – №11. – S. 32–35.</p> <p>2. Molekulyarno-geneticheskie svojstva rasprostranennyh v Belarusi bakteriofagov laktokokkov [Molecular genetic properties of lactococcal bacteriophages common in Belarus] / A. P. Rajsij, N. A. Belyasova, A. L. Lagonenko [i dr.] // Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. 2, Himiya. Biologiya. Geografiya. – 2009. – № 1. – S. 70–73.</p> |
|--|---|

3. Diversity of *Streptococcus thermophilus* Phages in a Large-Production Cheese Factory in Argentina / A. Quiberoni, D. Tremblay, H.-W. Ackermann [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2006. – Vol. 89, № 10. – P. 3791–3799.
4. Dairy lactococcal and streptococcal phage–host interactions: an industrial perspective in an evolving phage landscape / D. A. Romero, D. Magill, A. Millen [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2020. – Vol. 44, № 6. – P. 909–932.
5. Bacteriophage-host interactions as a platform to establish the role of phages in modulating the microbial composition of fermented foods / K. White, J. Yu, Giovanni Eraclio [et al.] // *Microbiome Res Rep*. -Vol. 1. – 2022.
6. Bacteriophage-host interactions in *Streptococcus thermophilus* and their impact on co-evolutionary processes / K. White, J. Yu, G. Eraclio [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2023. – Vol. 47, № 4. – P. fuad 032.
7. Dairy lactococcal and streptococcal phage-host interactions: an industrial perspective in an evolving phage landscape / D. A. Romero, D. Magill, A. Millen [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2020. – Vol. 44, № 6. – P. 909–932.